



2/9/1 (Item 1 from file: 351) Links  
Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

011604833

WPI Acc No: 1998-021961/199803

XRAM Acc No: C98-008175

**A new polypeptide and an antibacterial agent containing it -  
used as antifungal agents when sapecin can not be used**

Patent Assignee: AMANO PHARM KK (AMAN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No  | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 8143596 | A    | 19960604 | JP 94305509 | A    | 19941114 | 199803 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 94305509 A 19941114

Patent Details:

| Patent No  | Kind | Lan | Pg | Main IPC     | Filing Notes |
|------------|------|-----|----|--------------|--------------|
| JP 8143596 | A    |     | 8  | C07K-014/435 |              |

Abstract (Basic): JP 8143596 A

A polypeptide which shows amphipathic properties and has an amino acid sequence containing basic amino acids or its salt, is new. Also claimed are: (1) a polypeptide having the amino acid sequence: A-B-B-C-B-B-A-C-B-B-C (A = basic amino acid, B = hydrophobic amino acid not precluded from alpha -helix structure, C = hydrophilic amino acid not precluded from alpha -helix structure ) or its salt; (2) a polypeptide with the sequence (I), or its salt: His-Leu-Ala-Gln-Ala-Ala-His-Gln-Leu-Leu-Arg (I); and (3) an antibacterial agent containing the above polypeptide or its salt as the active component.

ADVANTAGE - The new polypeptide can be used as an antifungus agent in the field where sapecin could not be used.

Dwg.0/5

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; ANTIBACTERIAL; AGENT; CONTAIN; ANTIFUNGAL; AGENT; CAN

Derwent Class: B04; C03

International Patent Class (Main): C07K-014/435

International Patent Class (Additional): A01N-037/18; A61K-035/64; A61K-038/00; C07K-007/06

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01C; C04-C01C; B04-N03; C04-N03; B14-A01; C14-A01

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* F014 F521 H1 H100 H181 J0 J011 J012 J1 J171 J3 J371 K0 L2 L250 M280  
M312 M313 M314 M321 M331 M332 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391  
M423 M510 M520 M521 M530 M540 M620 M630 M640 M650 M710 M903 M904  
P241 Q233 V902 V913 V921 9803-08701-N

Generic Compound Numbers: 9803-08701-N

(11) 許世昌與公同登舟

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

民都市下取區密三連六橋上491

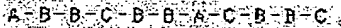
| SAEs                 | n (%) |
|----------------------|-------|
| 100                  | ~1    |
| 180                  | 100   |
| 250                  | ~95   |
| 25                   | ~85   |
| 12.5 ( $\alpha/25$ ) | ~55   |

**BEST AVAILABLE COPY**

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】両親水性を示し、尚且つ塩基性アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩。

【請求項2】次の式で示されるアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩。



（但し、Aは塩基性アミノ酸を示し、Bはαヘリックス構造を妨げない疎水性アミノ酸を示し、Cはαヘリックス構造を妨げない親水性アミノ酸を示す。）

【請求項3】配列番号1で示される新規ポリペプチドまたはその塩。

【請求項4】請求項1乃至請求項3記載の新規ポリペプチドまたはその塩を有効成分として含有する抗原剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、センテニクペ（*Sarcophaga peregrina*）幼虫体液中に誘導される抗腫瘍性ポリペプチドであるサペシン（*Sapecin*）のアミノ酸配列を、部位特異的変異をもちいて変異改変することにより得られたアミノ酸配列を有する新規な抗腫瘍性ポリペプチドに関する。この新規な抗腫瘍性ポリペプチドは抗原剤として利用が可能な。

【0002】

【従来の技術】細菌や真菌の血球を、昆虫に移植したり、昆虫に感染させるという特長を有する昆虫体液中に、数々の蛋白が誘導されることが知られている。これらの物質は、抗体産生を誘導しない動物の生体防御にとって重要な働きがあるものと考えられる。

【0003】これらのうちで、例えばセンテニクペ幼虫体液中に誘導される活性蛋白として、血球凝集作用をもつ蛋白（J. Biol. Chem. 255巻、2919-2924頁（1980））、抗腫活性を持つ蛋白（*Brothman*、J., 21巻、727-734頁（1983））などが同定されている。

【0004】前者のレクチン様蛋白は、サルコファガ（*Sarcophaga*）レクチンと命名され、マウスの骨髄細胞やマクロファージの細胞機能を増強させる、ヒトT細胞よりのインターフェロンの産生を誘く、生体防御等の作用が研究されている。

【0005】また後者の抗腫活性を持つ蛋白としては、例えばサルコトキシン（*Sarcotoxin*）Iと命名されてその理化学的性質も明らかにされている（特開昭59-137301号公報、サルコトキシンIと命名されてその理化学的性質も明らかにされている（特開昭63-35599号公報、および同様にセンテニクペの幼虫体液から得られ、サペシンと命名され、特開されてそのアミノ酸配列が決定されている（特開昭63-18999号公報）が知られている。

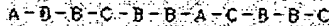
【0006】

【発明が解決しようとする課題】サペシンは46個のアミノ酸からなるポリペプチドで、アラミド性親水性部に対し幅広い抗腫活性を有している。しかしながら、抗原作用を発揮しない部位などもあり、これらに対する抗原力の強化が望まれていたと同時に、抗腫活性蛋白の活性部位の特定など、詳細な検討が必要とされていた。

【0007】即ち、これまでにサペシンなどの抗腫活性ポリペプチドの活性の発現に必要なアミノ酸配列については詳細に検討されたことはなく、本発明者は遺伝的変異をもちいてこれらを同定することに成功した。さらに本発明は、本来のサペシンが持たない抗腫力を備えた新規な抗腫性ポリペプチドを提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は両親水性を示し、尚且つ塩基性アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩並びにこれを有効成分とする抗原剤を提供する。更に詳細には、次の式で示されるアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩及びこれを有効成分とする抗原剤に関する。



【0009】上記アミノ酸配列において、Aは塩基性アミノ酸であり、具体的にはLys、ArgまたはHisを示す。Bはαヘリックス構造を妨げない疎水性アミノ酸であり、より具体的には、Tyr、Phe、Glyを除く疎水性アミノ酸を示す。またCはαヘリックス構造を妨げない親水性アミノ酸であり、より具体的には、Asn、Glnを除く親水性アミノ酸を示す。又本発明のポリペプチドは上記のアミノ酸配列のN末端及びC末端に更にアミノ酸を付加されていてもよい。

【0010】本発明において、アミノ酸は、以下のように略号で示される。

Asn: アスパラギン、Asp: アスパラギン酸、Ala: アラニン、Arg: アルギニン、Ile: イソロイシン、Gly: グリシン、Gln: グルタミン、Glu: グルタミン酸、Ser: セリン、Tyr: チロシン、Thr: チロニン、His: ヒスチジン、Leu: ロイシン、Pro: プロリン、Lys: リジン

【0011】本発明で提供されるより具体的なポリペプチドとしては、ヒスチジン（His）をN末端とし、11個のアミノ酸から構成され、カルボキシル末端がリジン（Arg）であるポリペプチドが挙げられる。

【0012】また、本発明のポリペプチドは、塩の形で取ることができ、例えば、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、塩酸、硫酸等の有機酸または無機酸の付加塩が含まれる。

【0013】本発明のポリペプチドは、ペプチド合成に適用される習知法など、容易に合成することが可能である。例えば、メリフィールドの方法（*Journal of Chemical Society*, 45巻、2149-2154頁（1965））に拠って合成することが可能である。また、市販のペプチドシ

ンキサイザーなどによっても合成することができる。更に本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を利用することで、遺伝子工学的手法を用いて大量に生産することが可能である。

【0014】得られた組成物ポリペプチドは、ケルシ、道、道用HPLC、イオン交換カラムなど、通常の蛋白質、ペプチドの精製に用いられる手段により高純度に精製することができる。

【0015】本発明のポリペプチドは、目的に応じて他の組成物として添加剤として利用される。即ち、それ単独または適当な担体などと組合せて薬液、添加剤として利用される。更に、他の薬剤と組合せて用いることもできる。

【0016】例えば、医薬、食品、飼料のみならず、コンタクトレンズの洗浄液、軟膏剤、石鹸、シャンプー、ペットフード、飼料ペーストなどの防腐剤および消毒剤として使用することもできる。

【0017】医薬としての使用としては例えば、細菌性疾患に対する治療および予防の薬剤として用いることができる。この場合は、疾患の種類、症状に応じて本発明の抗菌ポリペプチドが活性を有する限り任意の投与方法および投与量が選定される。

【0018】例えば、粉末、顆粒、錠剤、糖衣錠、錠剤、ドロップ剤、カプセル剤、灌腸剤、主剤、注射剤等の医薬組成物として、ヒトに経口的又は経皮的に安全に投与することである。これらは、医薬上許容される賦形剤を配合して製造される。

【0019】賦形剤としてはシロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガントゴム、ポリビニルピロリドン、ラクトース、澱粉、とうもろこし澱粉、蜂蜜、カルシウム、ソルビトール、グリシン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、脂肪酸、ナトリウムラウリルサルフェート、ポリビニルアルコール、ステアリン酸カルシウム、二酸化チタン、オリーブ油、ビーナフ油、ゴマ油などの植物油、パラフィン油、中鎖脂肪酸、エタノール、プロピレングリコール、生理食塩水、滅菌水、グリセリン等の油、着色剤、調味剤、緩衝剤、安定剤、保存剤、防腐剤などおよびその他医薬上許容されるものであれば使用できる。錠剤、糖衣錠は自明公知の方法によってフィルムコーティングすることもできる。

【0020】本発明の抗菌剤は、本発明のポリペプチドを0.001~1.000重量%、好ましくは0.005~6.0重量%含有することができる。

【0021】更に本発明のポリペプチドについて詳述する。本発明者はザーベシンについて鋭意研究の結果、ザーベシンの活性の発現に必要とされるアミノ酸残基を、部位特異的変異法をもちいて同定することに成功した。

【0022】更に、本発明者は活性中心となるアミノ

酸を調査検討したポリペプチドが、本来のザーベシンが抗菌活性を喪失しない点に対して抗菌力を示すことを見出し、本発明を完成した。

【0023】ザーベシンとは、塩基性アミノ酸に富んだ抗菌性ポリペプチド(The Journal of Biological Chemistry, 263号, 17112頁(1988))で、その一次構造は、配列番号2に示される。

【0024】このザーベシンは、センチニウバの幼虫体から得られ、更に、ザーベシン(Sapacin)をコードする遺伝子を宿主生物である酵母に組み込んで複製・転写し、該酵母を培養することによってザーベシンを大量に製造する方法(特開平4-33583)も知られている。

【0025】本発明者等は、ザーベシンのアミノ酸配列(配列番号1)において、3位、16位、20位、27位、30位及び38位の6つのヒスチジン残基は、3対のジスルフィド結合を形成していることが明らかとなっている。[Journal of Biochemistry, 107巻, 514頁(1990)]

ことより、このジスルフィド結合と、塩基性アミノ酸がザーベシンの活性の発現に必要であろうと予想し、これらについて詳細な解析を行った。

【0026】そこでまず、これらのジスルフィド結合と、塩基性アミノ酸をそれぞれに化学修飾して、活性への影響を調べることにした。

【0027】以下、実験例及び実施例を示しながら本発明を詳述する。尚、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0028】実験例1 ザーベシンの化学修飾  
ザーベシンのジスルフィド結合と塩基性アミノ酸(アルギニン、リシン、ヒスチジン)をそれぞれ特異的に修飾して、活性への影響をみた。

【0029】① ジスルフィド結合の開裂  
ザーベシンのジスルフィド結合を開裂するために、10mMのザーベシンを25mM DTT溶液[0.1M Tris-塩酸緩衝液(pH7.2)] 0.5mlに溶解し、抗菌活性を以下のようにして調べた。

【0030】感菌性試験(Staphylococcus aureus) 8029株をAmibiotic medium(以下、M3という)プレート培地(Difco製) 10mlに接種し、37℃でOD<sub>600</sub>=0.3になるまで培養培養した。

【0031】培養液、遠心分離(8000×g、15分)により菌体を回収して培養液D[30mM Tris-塩酸緩衝液(pH7.0)、60mM NaCl]にOD<sub>600</sub>が正確に0.3になるように調整した。この懸濁液0.04mlと0.16M M3液体培地と上記のザーベシン溶液0.2mlと0.2% BSAを含む、検出液D 0.2mlを試験管中で混合合わせて、37℃で3時間培養培養した。培養後、試験管を氷中で1時間冷却後、培養液のOD<sub>600</sub>を測定した。ザーベシン溶液の代わりに、25mM DTT溶液[0.1M Tris-塩酸緩衝液(pH7.0)]

2) 3) を0.5ml加入した時の培養液のOD<sub>600</sub>の値をコントロール値として、下記の式によりスレフ（ロコカス・アグリクスPDQ）の抑制率を算出した。

【0.03.2】抑制率 = (サーベシン溶解液に於けるOD<sub>600</sub> / コントロールのOD<sub>600</sub>) × 100

【0.03.3】その結果を図1に示した。ジスルフィド結合を阻害することにより、サーベシンの活性は高減した。

【0.03.4】④ Lys残基の修飾

Lys残基を修飾するために、サーベシン10μgを溶解液（500mM HEPES (pH7.5) / 2mM ルムアルデヒド / 10mM NaHCO<sub>3</sub>）0.5mlに溶解して25℃で90分インキュベートした。インキュベート後、修飾サーベシンの抗菌活性を①と同様に測定した。

【0.03.5】その結果を図2に示した。Lys残基の修飾によりサーベシンの抗菌活性は減弱した。

【0.03.6】⑤ Arg残基の修飾

Arg残基の修飾はペプチジルアルキルアミン化ミナーゼ（以下、PDIという）を用いて行った。サーベシン10μgを20mM CaCl<sub>2</sub>溶液（0.2M Tris-塩酸緩衝液（pH7.2））0.5mlに溶解して、ついでPDI 0.6ユニットを加え55℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、修飾サーベシンの抗菌活性を①と同様に測定した。

【0.03.7】その結果を図3に示した。Arg残基の修飾によりサーベシンの抗菌活性は減少した。

【0.03.8】⑥ His残基の修飾

His残基を修飾するために、サーベシン10μgを溶解液、

|    |                                     |              |
|----|-------------------------------------|--------------|
| #1 | 5'-GGGACTGGGATTTATTC-3'             | Cys 3 → Gly  |
| #2 | 5'-TGGCTGCTGCTGGCAT-3'              | Cys 16 → Gly |
| #3 | 5'-GGCATGCTCTTCAGAG-3'              | Cys 20 → Gly |
| #4 | 5'-CATTCCTTGTGGAGCAATCTGGG-3'       | Arg 23 → Gly |
| #5 | 5'-TTGAGAGCAATGCTGGGCTATTCGATG-3'   | Arg 26 → Gly |
| #6 | 5'-GGCTATTCGAATGCTGGAGCTGCTGGTA-3'  | Lys 33 → Gly |
| #7 | 5'-GCTGTCTGCTATGTGGCAATTAGCAATTC-3' | Arg 39 → Gly |
| #8 | 5'-ACTGGCATGATGGCTGGGCTTGGCT-3'     | His 23 → Gly |
| #9 | 5'-GCTGCTGCTGGGCTGGCTTGTG-3'        | His 29 → Gly |

【0.04.4】実験例3 変異サーベシンの活性測定

ウエスタンブロット法からの推察で、実験例2で得られた各種変異サーベシン及びサーベシンがほぼ等量になるように、実験例1で使用した抗菌活性の測定法に従い、その抗菌力を調べた。その結果を、表1に示した。活性の

\* 90mMリン酸緩衝液（pH7）/ 0.5M DEPC 0.5mlに溶解し、20℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、修飾サーベシンの抗菌活性を①と同様に測定した。

【0.03.8】その結果を図4に示した。His残基の修飾によりサーベシンの抗菌活性は減弱した。

【0.04.0】以上のからの結果の考察により、サーベシンの抗菌活性の発現には、ジスルフィド結合と3種の塩基性アミノ酸が重要であることがわかった。

【0.04.1】実験例2 サーベシン部位特異的変異体の作製

サーベシンの3種のジスルフィド結合と6種の塩基性アミノ酸のうち、どのジスルフィド結合並びにどの塩基性アミノ酸が、活性の発現に必要であるかを明らかにするために、部位特異的変異法を用いて各種変異サーベシンを作製し、これらの活性測定よりサーベシンの活性発現に必要なアミノ酸残基の特定を試みた。

【0.04.2】各種サーベシン部位特異的変異体の作製は、すでに明らかとなっているサーベシン遺伝子 [The Journal of Biological Chemistry, 263巻、17112頁 (1988)] を用いた酵母による組み換えサーベシンの発現系（特開平4-35883）と、ファーマシア社のScutellionインビトロミュータジェネシスキットを用いて行った。変異の導入に用いたプライマーの配列及び導入されたアミノ酸変換を下記に示す。尚、上記の各種変異サーベシンの発現は、ウエスタンブロット法で確認した。

【0.04.3】

|              |
|--------------|
| Cys 3 → Gly  |
| Cys 16 → Gly |
| Cys 20 → Gly |
| Arg 23 → Gly |
| Arg 26 → Gly |
| Lys 33 → Gly |
| Arg 39 → Gly |
| His 23 → Gly |
| His 29 → Gly |

活性は3段階（++、強、+、弱い、-、非常に弱い）で評価した。

【0.04.5】

【表1】

| 変異体番号 | 変換部位         | 活性 |
|-------|--------------|----|
| #1    | Cys 3 → Gly  | —  |
| #2    | Cys 16 → Gly | —  |
| #3    | Cys 20 → Gly | —  |
| #4    | Arg 23 → Gly | +  |
| #5    | Arg 26 → Gly | —  |
| #6    | Lys 33 → Gly | ++ |
| #7    | Arg 39 → Gly | —  |
| #8    | His 12 → Gly | —  |
| #9    | His 19 → Gly | —  |
| #10   | チライブチド       | ++ |

【0046】その結果、3つのジスルフィド結合は、いずれの結合も、また個個のアミノ酸のうちArg 26、Arg 39、His 12、His 19の活性の発現に重要であることがわかった。変異体#4では活性の減少はほとんど大きくなかった。Arg 26は前述の4つのアミノ酸よりは活性の発現に寄与していないものと推測される。

【0047】近々、ザーベシンのNMR解析が報告されており、Horie等<sup>1)</sup>の報告【REDS Letters, 269巻、417頁(1990)】によれば、Arg 23とArg 38は構造的に酸性リン脂質カルホリピンに結合しうる構造をとっていると考えられる。ザーベシンの黄色ブドウ球菌への活性発現はカルホリピンへの結合を介していると考えられているので、Arg 23とArg 38をGlyに置換した変異体#4と#7で活性が減少したのは、これらの変異体がカルホリピンに結合できなくなったためと考えられる。

【0048】一方、His 12とHis 19を含むHis 11からGly 24の間の領域はコンピューター解析で両末端性のαヘリックス構造をとると予測された。

【0049】いくつかのザーベシン以外の抗菌タンパクの抗菌活性は、このような正電荷を持った両親水性αヘリックスが抗菌作用を及ぼす領域にチャンネルを形成するか、あるいは界面活性剤の作用で膜構造を破壊するために引き起こされると考えられている。

【0050】したがって、変異体#8と#9で活性が顕著に減少したのは、活性の本体を担う両親水性αヘリックスの正電荷が失われ、チャンネル形成能あるいは界面活性剤作用を失ったためと考えられる。

【0051】変異例1：新しい抗菌性ポリペプチド。ザーベシンの活性本体がHis 11からGly 24の両親水性のαヘリックス構造に由来していると推察されたので、本

部分だけを合成して、新しいタイプの抗菌タンパクとして利用できないかと考えた。

【0052】よって、この領域の配列をもとに、より安定なαヘリックスを形成できるように一部のアミノ酸配列を代えて、配列番号：1に示されたアミノ酸配列をもつポリペプチド（以下、SAHという）を合成した。

【0053】変異例2：SAHの活性評価。SAHの活性評価を以下のように行なった。即ち、SAHを種々の濃度で、*Candida albicans*を含む培養液に10<sup>5</sup> cfu/mlの方法【The Journal of Biological Chemistry, 266巻、12058頁(1991)】に従って加え、その増殖への影響を調べた。その結果を図5に示す。

【0054】図より明らかのようにSAHは少なくとも1.25 μg/ml以上の濃度で*Candida albicans*の増殖を抑える抗菌活性を有することになった。ザーベシンは抗菌活性を有しないことは明らかで、この物質はザーベシンとは異なった活性をもつ新規な抗菌性ポリペプチドである。

【0055】

【発明の効果】本発明により得られる新規なポリペプチドは、これまでザーベシンが適用できなかった抗菌剤としての応用が可能であり、更にザーベシンよりも低分子であることより、医薬品と使用する場合の抗菌性の発現により有利である。

【0056】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

His Leu Ala Gln Ala Ala His Gln Leu Leu Arg

【0057】配列番号：2

※配列の型：アミノ酸

配列の長さ：40

※

配列

Ala Tyr Cys Asn Leu Leu Ser Gly Thr Gly Ile Asn His Ser Ala

15

Cys Ala Ala His Cys Leu Leu Arg Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys

30

Asn Gly Lys Ala Val Cys Val Cys Arg Asn

40

【配列の簡単な説明】

50 【図1】ザーベシンとジスルフィド結合を形成したザー

ペシンの抗菌活性を比較する図である。図中で左は修飾されたサーベシンの結果を示し、右はサーベシンの結果を示す。

【図2】サーベシンと11を修飾したサーベシンの抗菌活性を比較する図である。図中で左は修飾されたサーベシンの結果を示し、右はサーベシンの結果を示す。

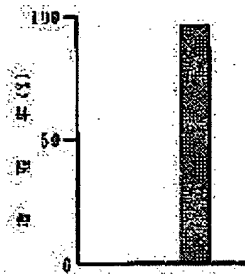
【図3】サーベシンのArgを修飾したサーベシンの抗菌活

性を比較する図である。図中で左は修飾されたサーベシンの結果を示し、右はサーベシンの結果を示す。

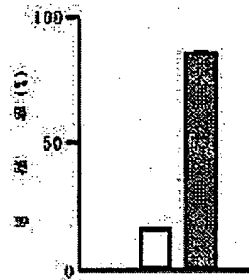
【図4】サーベシンのArgを修飾したサーベシンの抗菌活性を比較する図である。図中で左は修飾されたサーベシンの結果を示し、右はサーベシンの結果を示す。

【図5】SAH2のCandida albicansに対する抗菌活性とサーベシンの抗菌活性の比較を示す図である。

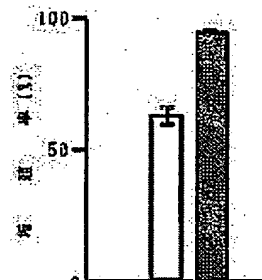
【図1】



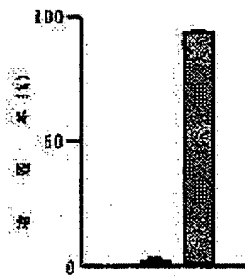
【図2】



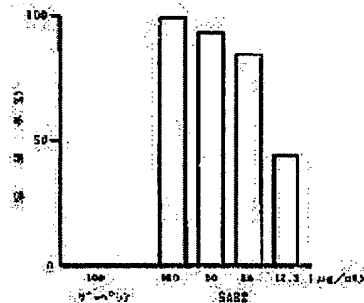
【図3】



【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成7年1月10日

【手続補正】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正内容】

【0045】

【表1】

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.